



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO REGIONAL**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**AMORA FIGUEIRÊDO DIAS**

**VARIAÇÃO SAZONAL NO ESTUDO METABOLÔMICO E NA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DA ERVA-CIDREIRA (*MELISSA OFFICINALIS*)**

**JOÃO PESSOA**  
**2017**

**AMORA FIGUEIRÊDO DIAS**

**VARIAÇÃO SAZONAL NO ESTUDO METABOLÔMICO E NA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DA ERVA-CIDREIRA (*MELISSA OFFICINALIS*)**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como pré-requisito para a  
obtenção do título de tecnóloga em  
Tecnologia de Alimentos pela  
Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Maria  
Fernandes de Oliveira Golzio

**JOÃO PESSOA**

**2017**

D541v Dias, Amora Figueirêdo.

Variação sazonal no estudo metabolômico e na atividade antioxidante da erva-cidreira (*Melissa Officinalis*). [recurso eletrônico] / Amora Figueirêdo Dias. -- 2017.  
44 p. : il. + CD.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

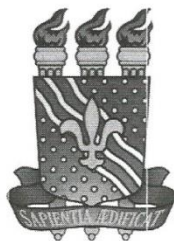
Orientador: Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Tecnologia de Alimentos) – CTDR/UFPB.

1. Erva cidreira – Perfil metabolômico. 2. Erva cidreira – Colheita. 3. Óleo essencial. 4. Atividade antioxidante. I. Golzio, Adriana Maria Fernandes de Oliveira. II. Título.

CDU: 582.949.27(043.2)

Catálogo na Publicação (CIP)  
Biblioteca Setorial do CTDR/UFPB, PB, Brasil



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO REGIONAL  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AMORA FIGUEIRÊDO DIAS

VARIAÇÃO SAZONAL NO ESTUDO METABOLÔMICO E NA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DA ERVA-CIDREIRA (*MELISSA OFFICINALIS*)

BANCA EXAMINADORA

Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio  
Profª Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio  
CTDR/UFPB

Fernanda Vanessa G. da Silva.  
Profª. Dra. Fernanda Vanessa Gomes da Silva  
CTDR/UFPB

J. P. de S. Prado  
Prof. Dr. João Paulo de Sousa Prado  
CTDR/UFPB

João Pessoa  
2017

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, minha profunda, eterna e sincera gratidão, por todo amor me dado, apoio, por fazerem de mim, todos os dias, uma pessoa melhor. O amor de vocês é a minha fonte de inspiração em tudo o que faço.

Aos meus irmãos amados, Cayan e Thais, por toda amizade, companheirismo, amor e união, vocês são os melhores irmãos do mundo.

Ao meu namorado, Gilson, por toda paciência, companheirismo, amor e incentivo. Seu apoio foi fundamental.

À minha amiga, Marcella Medeiros, por ser tão prestativa e presente na minha vida.

Às minhas amigas de infância, minhas irmãs de coração, Diandra Soares, Karol Menezes, Livia Fragoso, Marcella Medeiros e Priscilla dos Anjos, obrigada pela lealdade e confiança que nossa amizade nos dá.

À minha orientadora e professora querida, Adriana, primeiramente, por ter confiado em mim para me orientar, e depois, por ter sido muito solícita e paciente comigo, por todo ensinamento e apoio. Tive muita sorte de ter a senhora me orientando.

À Gabriella Greyce, que foi fundamental para a realização desse trabalho, obrigada por toda ajuda, presteza e apoio durante toda a pesquisa.

À todos meus professores do CTDR que contribuíram com ensinamentos valiosos para minha formação.

Ao professor João Paulo, por toda paciência nas aulas laboratoriais e aprendizados que pude realizar na prática durante minha pesquisa.

À professora Fernanda Vanessa, por aceitar participar da banca e por todo ensinamento.

Aos amigos, Breno Eduardo e Jobson Oliveira, por toda ajuda prestada e contribuição fundamental para meu trabalho.

À minha amiga Sulamita, por toda amizade e sofrimentos que passamos juntas durante o curso e por saber que fiz uma amizade que vai além da vida acadêmica.

À minha amiga, Márcia Thays, que também sofreu comigo durante o curso e me deu suporte, principalmente nesta etapa final do curso.

Ao técnico do Laboratório de Análises Físico-Químicas do CTDR, José Carlos, por toda colaboração.

Ao bolsista da minha orientadora, Leonardo, pela ajuda durante a realização das análises.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão de uma das etapas mais importantes da minha vida. Meus sinceros agradecimentos!

## **Dedico,**

Aos meus maiores incentivadores e exemplos de vida, meus pais, Clóvis Júnior e Cassandra Figueirêdo. E meus melhores companheiros, meus irmãos, Thais e Cayan.

*“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda”. (Paulo Freire)*

*Que dias melhores tragam de volta  
O direito à educação,  
o direito à expressão,  
E uma conscientização política justa e  
igualitária.*

## RESUMO

A utilização de plantas como forma de alimento com finalidades benéficas à saúde humana tem despertado o interesse em conhecer as propriedades e atuação das plantas sob seus efeitos no organismo. A família Lamiaceae é conhecida por apresentar princípios ativos com efeitos importantes, a *Melissa officinalis*, por exemplo, é uma planta que atua no tratamento de doenças, alívio de sintomas e por possuir substâncias antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da variação sazonal no perfil metabolômico e na atividade antioxidante da *Melissa officinalis*. Para este trabalho, foram coletadas partes aéreas da *Melissa officinalis* em dois horários, às 07:00 e às 16:00 horas para seu estudo metabolômico, utilizando a cromatografia gasosa acoplada espectrofotômetro de massa (CG-EM), a atividade antioxidante foi determinada pelos métodos: DPPH, e a Capacidade antioxidante equivalente ao trolox. O teor de fenólicos totais foi mensurado utilizando o reagente Folin Ciocalteu. O resultado do estudo metabolômico constatou uma maior quantidade do composto majoritário, citral, no período da tarde e concentrações dos constituintes semelhantes em relação às duas amostras, para as duas coletas. Na atividade antioxidante, no teste do DPPH, houve diferença significativa, da CE<sub>50</sub>, entre as coletas da manhã ( $146,46 \pm 1,35 \mu\text{g/mL}$ ) e da tarde ( $255,5 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ ), em relação ao ácido ascórbico ( $7,37 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ ) e em relação as coletas. No teste da Capacidade antioxidante equivalente ao trolox, a amostra da manhã apresentou um valor de CE<sub>50</sub> de  $48,48 \pm 2,48 \mu\text{g/mL}$ , havendo diferença significativa em relação à coleta da tarde, com uma CE<sub>50</sub> (concentração efetiva) de  $55,46 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$ . Também houve diferença entre as coletas e o Trolox, composto padrão, que apresentou uma CE<sub>50</sub> de  $2,03 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ , ambos os métodos, relataram maior atividade no período da manhã. Para a determinação dos compostos fenólicos totais, o período da manhã apresentou  $2,01 \pm 0,08 \text{ mg/g}$  e o horário da tarde com  $1,16 \pm 0,08 \text{ mg/g}$ , apresentando diferença significativa entre elas. Este trabalho concluiu que o horário correto para a colheita das ervas é essencial para a obtenção dos constituintes desejados, e sugere mais pesquisas voltadas à determinação de atividade antioxidante e determinação dos compostos fenólicos totais em relação ao horário de colheita.

**Palavras-chaves:** *Melissa officinalis*, óleo essencial, DPPH, ABTS, compostos fenólicos.



## ABSTRACT

The use of plants as a form of food with beneficial purposes to human health has aroused the interest in knowing the properties and performance of plants under their effects in the body. The Lamiaeceae family is known to present active principles with important effects, *Melissa officinalis*, for example, is a plant that acts in the treatment of diseases, relief of symptoms and by having antioxidant substances. The present work aimed to evaluate *Melissa officinalis*, consumed mainly in the form of tea and to contribute with more information about the plant. For this work, aerial parts of *Melissa officinalis* were collected at two hours, at 7:00 am and 4:00 p.m. for their metabolomic study, through gas chromatography and mass spectrophotometer (GC-MS), determination of antioxidant activity by DPPH method, using ascorbic acid as the standard compound, and the antioxidant capacity equivalent to trolox. For the determination of the total phenolic compounds, by means of Folin Ciocalteu reagent and gallic acid as standard. The result of the metabolomic study found in the greater amount of the citral compound in the afternoon and concentrations of the similar constituents in relation to the two samples. For the determination of the antioxidant activity, the DPPH test, there was a significant difference of the EC<sub>50</sub> (effective concentration) between the morning collections ( $146.46 \pm 1.35 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) and the afternoon ( $255.5 \pm 0.9 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), as compared to ascorbic acid ( $7.37 \pm 0.05 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) and for antioxidant capacity equivalent to trolox, the morning sample had an EC<sub>50</sub> value of  $48.48 \pm 2.48 \mu\text{g} / \text{mL}$ , With a significant difference in relation to the afternoon collection, with an EC<sub>50</sub> of  $55.46 \pm 1.04 \mu\text{g} / \text{mL}$ . There were also differences between the samples and Trolox, a standard compound, which presented an EC<sub>50</sub> of  $2.03 \pm 0.03 \mu\text{g} / \text{mL}$ , both methods, reported higher activity in the morning. For the determination of the total phenolic compounds, the morning period presented  $2.01 \pm 0.08 \text{ mg} / \text{g}$  and the afternoon time with  $1.16 \pm 0.08 \text{ mg} / \text{g}$ , presenting a significant difference between them. This work concluded that the correct time for harvesting the herbs is essential to obtain the desired constituents, and suggests more research aimed at the determination of antioxidant activity and determination of the total phenolic compounds in relation to the time of harvest.

**Keywords:** *Melissa officinalis*, essential oil, antioxidant, DPPH, ABTS, phenolics compounds.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Perfil metabólico da *M. officinalis* coletada às 07h00 horas.....29

**Tabela 2** - Perfil metabólico da *M. officinalis* coletada às 16h00 horas.....31

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** - Teor de Fenólicos Totais das amostras coletadas no período da manhã (07h00) e no período da tarde (16h00) .....35

**Gráfico 2** - Atividade antioxidante pelo método do DPPH, das amostras coletadas no período da manhã (07h00) e no período da tarde (16h00) .....37

**Gráfico 3** - Atividade antioxidante, pelo método da Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, das amostras coletadas no período da manhã (07h00) e no período da tarde (16h00).....38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
CE50	Concentração Efetiva para inibir 50% dos radicais livres
DPPH	2,2-Difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazil
E.P.M	Erro Padrão Médio
EtOH	Álcool etílico
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
Trolox	(ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2 OBJETIVOS</b>	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	17
3.1 Plantas na alimentação	17
3.2 Família Lamiaceae	18
3.2.1 <i>Melissa officinalis</i>	18
3.3 Estudo Metabolômico	19
3.3.1 Metabólitos Secundários	20
3.3.2 Método de análise para o estudo metabolômico	21
3.4 Atividade Antioxidante	22
<b>4 ASPECTOS METODOLÓGICOS</b>	24
4.1 Caracterização da pesquisa	24
4.2 Local da pesquisa	24
4.3 Instrumentos e procedimentos	24
4.3.1 Equipamentos	24
4.3.2 Reagentes	24
4.4 Coleta e procedimentos para obtenção do material vegetal	25
4.4.1 Preparação do extrato vegetal	25
4.4.2 Perfil metabolômico	26
4.4.3 Determinação do teor de fenólicos totais	26
4.4.4 Atividade antioxidante de <i>M. officinalis</i>	26
4.4.5 Atividade sequestradora do radical DPPH*	26
4.4.6 Capacidade antioxidante equivalente ao trolox (CAET)	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	29
5.1 Perfil metabolômico	29
5.2 Determinação dos compostos fenólicos totais	35
5.3. Atividade Antioxidante	37
<b>6 CONCLUSÕES</b>	40
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	41

## 1 INTRODUÇÃO

A *Melissa officinalis*, pertencente à família Lamiaceae, é uma planta medicinal de fundamental interesse para o setor econômico devido às suas funções terapêuticas comprovadas (OLIVEIRA; MACHADO; RODRIGUES, 2014). São exemplos da família Lamiaceae, além da *Melissa officinalis* (erva-cidreira), as plantas *M. piperita* L. (hortelã), *Ocimum basilicum* L. (manjerição), *O. vulgare* L. (orégano) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), conhecidas principalmente no uso condimentar nos alimentos (LORENZI; MATOS, 2002).

De acordo com Kennedy (2002), a *M. officinalis* é utilizada, na forma de chá, desde muitos anos para efeitos benéficos ao sistema nervoso, sendo aplicado para efeito antibacteriano, antiespasmolíticos e sedativo, contribuindo para a redução da excitabilidade, ansiedade e estresse. Obtém importante atuação antiviral, como no caso do vírus do herpes e na cicatrização de feridas (LORENZI; MATOS, 2002), auxilia nas funções gástricas e estomacais (SADRAEI; GHANNADI; MALEKSHAHI, 2003) e os constituintes da erva-cidreira apresentam alta atividade antioxidante (TEKEL; et al, 1997).

A capacidade antioxidativa da família Lamiaceae, provoca a interrupção da cadeia de radicais livres no início do processo oxidativo. Desta forma, tornam-se possíveis estudos que busquem a substituição de antioxidantes sintéticos por compostos naturais (LAI; et al., 1991).

O efeito do excesso de radicais livres no organismo promove reações que podem ocasionar doenças degenerativas, envelhecimento, queda de imunidade, entre outros (SOUSA; et al., 2007). No setor alimentício, são utilizados antioxidantes sintéticos como forma de aumentar a vida de prateleira do produto, atuando na inibição da oxidação lipídica ocasionada pelos radicais livres, onde os antioxidantes agem retardando ou inibindo a ação oxidativa. Contudo, o excesso de antioxidantes sintéticos, pode ocasionar efeitos tóxicos à saúde humana. Diante disso, a busca por antioxidantes naturais está sendo incentivada, a fim de combater a oxidação e assegurar efeitos benéficos à saúde. Extratos de materiais vegetais contendo ácidos fenólicos, ascórbicos, tocoferóis, etc. são alternativas para inibir a oxidação provocada pelos radicais livres (SUN-WATERHOUSE; THAKOARLAL; ZHOU, 2011).

Uma alternativa para preservar a atividade antioxidante da planta, sem a perda de compostos, é a compreensão das influências ambientais que podem agir sobre a composição do vegetal.

O conhecimento sobre o comportamento das plantas medicinais em relação às condições externas, como a intensidade solar, é fundamental para compreender qual o método de cultivo é o mais adequado para o melhor aproveitamento de cada planta (SOUZA; et al., 2011).

Através do estudo metabolômico, é possível obter a identificação e quantificação dos constituintes da planta no horário exato em que ela foi coletada, constatando sua real composição. O perfil metabolômico da maioria das plantas consta de metabólitos secundários, responsáveis pela interação da planta com o meio externo (doenças, insetos, calor excessivo, etc.) (VEERPORTE; et al., 2008).

O horário de coleta das plantas configura-se um ponto significativo na produção do estudo proposto. As alterações ambientais geradas durante o dia podem influir, ativa ou passivamente, às concentrações dos constituintes presentes nestas (LEAL; FREITAS; CARVALHO, 1998). Sendo assim, a composição dos óleos essenciais não depende somente de fatores genéticos (LIMA; KAPLAN; CRUZ et al., 2003).

Esse trabalho busca entender como a diferença do horário de coleta influencia na quantificação dos constituintes da *M. officinalis* e determinar o teor antioxidante da planta, visando contribuir com os estudos científicos voltados para as plantas medicinais, podendo, dessa forma, ampliar o conhecimento sobre o material de estudo, para uma melhor compreensão de sua utilização e seus benefícios.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da variação sazonal no perfil metabolômico e na atividade antioxidante da erva-cidreira (*Melissa officinalis*).

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil metabolômico da planta, coletada em dois horários diferentes, em um mesmo dia, através do uso da cromatografia gasosa;
- Estimar a atividade antioxidante da *Melissa officinalis*, utilizando metodologias *in vitro*;
- Certificar o horário ideal de coleta da erva-cidreira.



### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Plantas na alimentação

O chá é a segunda bebida mais consumida no mundo, perdendo apenas para a água. Seu mercado é bastante rico e extenso produzindo mais de trezentas espécies diferentes de chás. A partir de relatos sobre sua eficácia, as pesquisas científicas suscitaram sobre as possíveis reações benéficas ocasionadas através do seu consumo, como na prevenção de disfunções crônicas (HARBOWY; BALENTINE, 1997). Os primeiros relatos sobre seu consumo foi há 5000 anos atrás, na China. Sua ingestão era realizada através de plantas consideradas medicinais utilizadas para purificar o corpo e melhorar a imunidade sobre possíveis doenças (HARA; et al., 1995).

De acordo com CRAIG (1999), estudos afirmam que o chá ajuda a diminuir o desenvolvimento de doenças-degenerativas, como também na diminuição do colesterol, pressão arterial e outras manifestações associadas à doenças cardiovasculares. A ação antioxidante do chá está interligada a sua composição química que tem capacidade de ligar e neutralizar os radicais livres, responsáveis por provocar disfunções no organismo.

No Brasil, são comercializados diferentes tipos de chás provenientes de plantas medicinais. Os chás de boldo, por exemplo, é consumido com finalidade digestiva, o chá de camomila possui funções sedativas, analgésicas, antitérmicas, no alívio de cólicas e formação de gases e a erva cidreira auxilia de maneira similar, provocando efeito calmante, antiespasmódico, digestivo e analgésico (Inmetro, 1998). Dessa forma, o conhecimento popular, aliado às pesquisas científicas, possibilita o enriquecimento das propriedades e benefícios das variadas espécies de plantas com finalidades fitoterápicas, contribuindo para a ampliação do seu consumo e elaboração de novos remédios ou produtos que apresentem os compostos específicos da planta analisada. (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2001).

### 3.2 Família Lamiaceae

A família Lamiaceae é proveniente da região Mediterrânea e Oriental, compõe cerca de 3.500 espécies vegetais. Exemplos de espécies que integram-se à Família Lamiaceae são: alecrim (*Rosmarinus* sp.), orégano (*Origanum* sp.), manjerição (*Ocimum* sp.), menta (*Mentha* sp.) e erva-cidreira (*Melissa officinalis*) (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007). O alto número de metabólitos secundários presentes nessas espécies tem despertado o interesse devido seus efeitos fitoterápicos (LORENZI; MATOS, 2002), ocasionados devido ao alto nível de óleos essenciais em algumas espécies (LIMA; CARDOSO, 2007) e compostos fenólicos nas folhas (BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2005), agindo como antioxidantes (RIBEIRO; et al, 2001).

A maior parte das espécies é conhecida através do seu uso como condimentos alimentar (LORENZI; MATOS, 2002), mas também são utilizados para fins fitoterápicos (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

#### 3.2.1 *Melissa officinalis*

A *Melissa officinalis* L., é uma planta medicinal e aromática pertencente a família Lamiaceae, popularmente conhecida como erva-cidreira, mas que também é chamada por outros nomes como: cidrila, chá-da frança, erva-luísia, melissa romana, chá-de-tabuleiro entre outros (LORENZI; MATOS, 2002).

É originária da Europa e Ásia, porém, é produzida em vários países. O calor excessivo e baixa temperatura dificultam seu desenvolvimento, portanto, climas temperados, com locais parcialmente sombreados, são ideais para o crescimento da planta (LORENZI; MATOS, 2002). Seu tamanho varia de 20 a 80 cm de altura, e suas folhas é de coloração verde, sendo mais intensa na parte superior da folha e mais clara na região inferior da planta. Suas flores, na fase jovem, são brancas, passando para rosa durante o desenvolvimento da planta (LAUNERT, 1989). Possui um odor agradável, semelhante ao do limão, principalmente quando a folha está seca, isso se deve ao fato da planta possuir citral, um composto pertencente a classe dos óleos voláteis, considerado um metabólito secundário (REIS; et al, 2009). Seus compostos químicos principais são os taninos e os óleos essenciais (MARTINS; et al., 2000). Situações adversas, como calor excessivo e ventos fortes

podem ocasionar a perda dos óleos voláteis da planta, tornando seu odor mais ameno. (COLUSSI; et al, 2011).

As folhas e inflorescência da erva-cidreira são utilizadas na forma de chá que possui funções sedativa, indutora do sono, atuando como calmante, auxiliando no controle de ansiedade como também no sistema regulador das funções gástricas e estomais (SADRAEI; GHANNADI; MALEKSHAHI, 2003), auxilia no sistema circulatório e cardíaco, além de aliviar a pressão arterial (TESKE; TRENTTINI, 1997). Também são empregadas na elaboração de bebidas, como licor, sucos e refrescos (HALVA; CRAKER, 1996). Na alimentação, servem como aromatizantes (MARTINS; et al.,2000), como condimento para temperar carnes (TEKEL; et al, 1997) e para tempero nas saladas (HALVA; CRAKER, 1996) devido o seu odor e sabor agradável. Em cosméticos, a planta auxilia no combate a inflamações como alergias, herpes labial e espinhas. (MING, 1992). E de acordo com TESKE; TRENTINI, (1997), pode ser utilizado para alívio de dores relacionados a picadas de insetos.

### 3.3 Estudo Metabolômico

O estudo metabolômico trata-se de um conjunto de elementos que analisa quantitativamente micromoléculas de um corpo em um determinado tempo e condições externas, tendo como objetivo conhecer a composição metabólica do organismo estudado. Para um estudo metabolômico eficaz é preciso observar grande quantidade da amostra para poder identificar e enfim analisar seu comportamento e suas alterações metabólicas diante condições adversas, como estresse, seja pelo calor, raios ultravioletas, desidratação, etc. (VERPOORTE; et al., 2008). A quantidade de metabólitos secundários presentes na planta irá depender de fatores como estado de desenvolvimento, adubação, clima, solo, etc. (MARTINS; et al., 2000).

Os metabólitos apresentam duas classes: os primários, que são essenciais para a realização da biossíntese dos aminoácidos e respiração da célula, mantendo as funções do organismo e estão presentes na maioria dos seres vivos. E os secundários, que se encontram, na sua grande maioria, em plantas que são responsáveis pela interação da planta com o meio ambiente, podendo contribuir através de atividades que conservem e protejam as plantas, agindo contra fungos,

vírus, doenças, insetos, além de proteger contra os raios ultravioletas, entre outros fatores externos, auxiliando no maior tempo de vida da planta (VERPOORTE; et al., 2008). Os compostos secundários são utilizados na área cosmética, na elaboração de medicamentos produtos nutracêuticos. (FUMAGALI; et al, 2008).

### 3.3.1 Metabólitos Secundários

O metabolismo é determinado como sendo o conjunto de reações que ocorrem na célula de um organismo, buscando atender às necessidades da célula. A concentração dos metabólitos ocorre a partir das alterações de moléculas orgânicas que são catalisadas por enzimas. As enzimas catalisadoras determinam duas rotas metabólicas que vão garantir o suplemento para as células da planta, determinando os metabólitos primários e secundários (CARDOSO; PEREIRA, 2012).

A síntese dos metabólitos secundários pode ser resumida através do metabolismo de glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico é responsável pela presença de aminoácidos aromáticos, taninos, fenilpropanóides, em geral, compostos que possuem um anel aromático. E a rota do acetato origina aminoácidos alifáticos e seus alcaloides, esteroides, ácidos graxos, terpenóides e triglicerídeos (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os metabólitos secundários podem ser encontrados, de forma limitada, em algumas espécies vegetais apesar de seu baixo rendimento, apresentam alta atividade biológica, sendo de grande interesse para áreas farmacêuticas e alimentícias. São substâncias voláteis que possuem pouca estabilidade, baixo peso molecular e apresentam uma cor amarelada ou incolor (CHAVES, 2012)

Apesar de seu baixo rendimento, seu vasto desempenho oriundo de suas propriedades, proporciona aos pesquisadores, possibilidades de soluções relacionadas às doenças no ser humano, como também, a perspectiva de uma fonte antibacteriana e antioxidante (CHAVES, 2012).

Os óleos essenciais são exemplos de metabólitos secundários que podem ser localizados na raiz, caule, folha, flores e sementes da planta. Sua definição pode ser dada como produto extraído nas partes das plantas através da destilação por arraste com vapor d'água (SANTOS, 2004). A capacidade inibitória dos óleos essenciais em microrganismos, além de suas propriedades antioxidante, antifúngica e

antibacteriana, despertam o interesse no mercado, não só farmacológico, como também alimentício, como uma alternativa de substituição de aditivos químicos prejudiciais à saúde (PEREIRA, 2006).

### 3.3.2 Método de análise para o estudo metabolômico

Através das análises metabolômicas é possível descobrir a especificidade do organismo diante às condições que ela sofreu durante a coleta e cultivo, objetivando a influência dos fatores externos sob o comportamento metabólico do componente estudado, principalmente no que se refere às alterações ocorridas devido a fatores de estresse (LEME, 2011). Para obter uma análise aprimorada dos metabólitos é preciso utilizar técnicas que agreguem a seletividade, rapidez e sensibilidade da amostra. (ABDELNUR, 2011). A facilidade que o método cromatográfico exerce para separar, identificar e quantificar as espécies químicas de um composto, confere a cromatografia um papel de destaque entre os métodos de análises. A cromatografia gasosa pode ser aplicada para separar substâncias voláteis ou gases, distribuindo o composto de forma desigual entre uma fase estacionária e a fase móvel. A capacidade da cromatografia gasosa em detectar as substâncias necessitando de pouca quantidade da amostra para muitas técnicas pode ser considerada um fator crítico. Sendo assim, um excelente método quantitativo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

### 3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são definidos como qualquer substância, que em baixa concentração, reduz ou previne a oxidação lipídica ou de outras moléculas (ATOUI; et al., 2005), a partir da formação de compostos estáveis que são neutralizados por um radical, pois os radicais gerados através dos antioxidantes não são reativos para se propagar. Os antioxidantes naturais têm sido estudados como um associado na diminuição de doenças relativas ao estresse oxidativo. Sua capacidade antioxidativa atua freando a produção dos radicais livres no organismo (VALKO; et al, 2004).

Os radicais livres atuam na produção de energia, síntese da constituição biológica, controle do crescimento celular, porém em grande quantidade podem atacar carboidratos, enzimas, DNA e proteína das membranas e tecidos. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005). Pesquisas apontam que oxidantes, como os radicais livres, são agentes que promovem reações no organismo como doenças degenerativas, envelhecimento, distúrbio mental, doenças cardiovasculares e queda da imunidade. (HALLIWELL, GUTTERIDGE, CROSS, 1992; SOUSA, et al., 2007).

Um dos principais compostos antioxidantes presentes nos alimentos são os compostos fenólicos que atuam, agindo no potencial redox, em que eles se comportam reduzindo ou doando oxigênio ao meio, atuam no combate aos radicais livres e também na reposição das células danificadas por eles, além de neutralizar reações dos radicais livres, atuar no potencial quelante de metais, proporcionando influências benéficas à saúde. Sua estrutura química é formada por no mínimo um anel aromático com substâncias hidroxílicas, e devido a sua estrutura ser variante, possui capacidades multifuncionais. Nos vegetais, se encontram tanto a forma livre ou ligada ao glicosídeo e proteínas (ANGELO, JORGE, 2007). São condensados através de duas rotas: rota do chiquimato e a rota do acetato. (MORAES-DE-SOUZA, 2007).

Os compostos fenólicos podem ser subdivididos em quatro: os ácidos hidroxibenzóicos, cumarinas, ácidos hidroxicinâmicos, e os flavonóides, com destaque para este último que são largamente encontrados em frutas, plantas e sementes, além de possuir alta atividade antioxidante (MORAES-DE-SOUZA, 2007). Para conseguir a quantificação dos compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante do vegetal, é preciso que através de métodos, seja identificado tais

compostos e assim prosseguir com os métodos de análises (SUCUPIRA; et al., 2012).

O método Folin Ciocalteu é um método espectrofotométrico utilizado para identificar e quantificar o teor de compostos fenólicos, podendo ser observado a partir de um espectrofotômetro, através de uma curva de calibração com os valores da absorbância em intervalos diferentes (SUCUPIRA; et al., 2012).

O método utilizado para determinação da atividade antioxidante, um dos mais conhecidos e utilizados é o método do radical livre DPPH, um método químico capaz de seqüestrar radicais livres, determinando, dessa forma, a capacidade antioxidante que o composto observado possui. Sua particularidade é a de não precisar de temperatura e oxigenação em condições extremas, podendo ser utilizada para determinação da atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas. É um método prático e rápido (BORGES; et al., 2011).

O método ABTS também é utilizado para determinação de atividades antioxidantes diversas. Tem como vantagem a capacidade de reagir com soluções hidrossolúveis e lipossolúveis. Através da mudança da coloração, é observado a presença dos compostos antioxidantes (LIMA, 2008). É um método rápido e com ótima estabilidade (SUCUPIRA; et al, 2012). Além de o método apresentar vantagens como maior solubilidade e versatilidade quanto ao tipo de amostra.

A partir da reação do ABTS, um radical estável, com o perssulfato de potássio que se reduz ao  $ABTS^{\bullet+}$ , com estabilidade menor, podendo ser vista no espectrofotômetro. O radical  $ABTS^{\bullet+}$  quando aplicado às análises antioxidantes é observado por um espectrofotômetro e depois comparado com o trolox (composto padrão) (RE; et al, 1999).

Os métodos de análises antioxidantes possuem importância quanto a descoberta de compostos capazes de inibir, neutralizar e romper reações de radicais livres, combatendo possíveis doenças degenerativas relacionadas aos radicais. Para obter resultados efetivos e satisfatórios é fundamental a utilização de mais de um método, correspondentes as diferentes ações dos radicais livres (SUCUPIRA; et al, 2012).

## **4 ASPECTOS METODOLÓGICOS**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA**

O presente estudo se trata de uma pesquisa de bibliográfica, por ser realizada a partir de referenciais teóricos já analisados e publicados, permitindo um embasamento prévio acerca da temática proposta (FONSECA, 2002). E também experimental, sendo realizados experimentos em laboratório, com a finalidade de delimitar o objeto de estudo, apontando as variáveis passíveis de influência, definido os tipos de controle e apreciação das reações que a variável causa ao objeto (GIL, 2007).

### **4.2 LOCAL DA PESQUISA**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM), do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), no Unidade de Caracterização e Análise (UNICAL), do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos, e no Laboratório de Análises Físico-químicas, do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR), todos localizados da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

### **4.3 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS**

#### **4.3.1 Equipamentos**

- Balança analítica;
- Estufa para a secagem;
- Triturador;
- Evaporador rotativo;
- Bomba de vácuo;
- Cromatógrafo gasoso;
- Espectrofotômetro UV/Vis.

#### **4.3.2 Reagentes**

- Álcool etílico;



- Hexano;
- Reagente de Folin Ciocalteu;
- Carbonato de sódio;
- 2,2-Difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazil (DPPH);
- Ácido ascórbico;
- 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS);
- Persulfato de potássio
- Trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

#### 4.4 COLETA E PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A *Melissa officinalis* foi coletada no horto do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFARM), localizado na Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. As coletas foram realizadas em dois horários diferentes do mesmo dia, às 07:00 horas e às 16:00 horas, para avaliar a influência dos horários sob a planta.

##### 4.4.1 Preparação do extrato vegetal

Após a coleta, as folhas foram removidas dos galhos e, posteriormente, pesadas. A amostra da manhã obteve 53,38 g de folhas e a da tarde 56,01 g.

Para a análise cromatográfica, foram separadas 8,01g da coleta da manhã e 8,01 g da coleta da tarde. As folhas *in natura* foram fragmentadas a um tamanho menor e misturadas a 40,00 ml de hexano, durante duas horas. Realizadas das 09h20min às 11h20min e 16h30min às 18h30min, para as coletas da manhã e da tarde, respectivamente. O líquido extraído foi encaminhado para a Unidade de Caracterização e Análises, para a análise dos óleos essenciais.

Para a obtenção do extrato vegetal, para determinar a atividade antioxidante, as folhas foram partidas ao meio para facilitar a secagem e colocadas em estufa a 60°C, no período de 24 horas. Após a secagem, as folhas foram trituradas, já que são comercializadas nessa forma, e colocadas em 900 ml de álcool etílico, e permaneceram em repouso por 24 horas. Após a filtragem, as amostras foram encaminhadas para o evaporador rotativo acoplado à bomba de vácuo, na temperatura de 68°C, para a obtenção do extrato vegetal.

#### 4.4.2 Perfil metabolômico

Para a avaliação do perfil metabolômico da planta, utilizou-se Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas: Modelo: GCMS-QP2010 Ultra | Marca: Shimadzu. Coluna: marca: RTX-5MS capilar (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane). Tamanho: 30 m (comprimento) / 0.25 mm de Diâmetro Interno / 0.25 um df.

#### 4.4.3 Determinação do teor de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais presentes no extrato bruto de *M. officinalis* foi realizada utilizando o Reagente de Folin Ciocalteu. Uma alíquota de 500 µL do extrato, todas provenientes de uma solução estoque de 1mg/mL, solubilizados em EtOH foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, adicionando-se 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 3 mL de água destilada, agitando-se por 1 min. Em seguida, 300 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15%) foram acrescentados à mistura e agitados por 30 segundos. Finalmente a solução teve seu volume aferido para 5 mL com água destilada. Após duas horas, a absorbância das amostras foi medida a 760 nm. Foi construída uma curva de calibração de ácido gálico, utilizando concentrações que variaram de 0,5 a 25 µg/mL. A concentração dos compostos fenólicos totais foi expressa como micrograma de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (µg EAG/g).

#### 4.4.4 Atividade antioxidante de *M. officinalis*

#### 4.4.5 Atividade sequestradora do radical DPPH<sup>•</sup>

A atividade seqüestradora do radical DPPH foi determinada de acordo com a metodologia de SILVA et al. (2006). Em um tubo de ensaio com 3 mL de uma solução de DPPH<sup>•</sup> (23,6 µg/mL em EtOH) foi misturado quantidades apropriadas (provenientes de uma solução estoque de 1 mg/mL, e obtidas através de uma triagem preliminar), acompanhadas pela homogeneização. Após 30 min de agitação em aparelho de ultra-som, a quantificação do radical DPPH<sup>•</sup> foi realizada em espectrofotômetro UV-visível a 517nm. As análises foram realizadas em triplicata (n =

3). A percentagem da atividade seqüestradora (% AS) foi calculada pela equação:  $\% AS = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$  onde  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância do controle, uma solução que contém apenas o radical DPPH· e EtOH, e  $A_{\text{amostra}}$  é a absorbância do radical na presença dos extratos ou do padrão ácido ascórbico.

#### 4.4.6 Capacidade antioxidante equivalente ao trolox (CAET).

A determinação da CAET foi determinada de acordo com RE et al. (1999), usando o Trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como composto padrão.

O cátion ABTS<sup>•+</sup> foi preparado pela reação de 7mM de ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) com 2,45mM de persulfato de potássio. A mistura foi deixada no escuro, a temperatura ambiente, por 12-16h, antes do uso. Para a avaliação da atividade, a solução ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em etanol (1:99 v/v, aproximadamente) até obter um absorbância de  $0,7 \pm 0,02$ , no comprimento de onda de 734nm. Quantidades apropriadas das amostras (provenientes de uma solução estoque de 1 mg/mL e obtidas através de uma triagem preliminar) ou do padrão Trolox (concentrações de 6 a 18 µM) foram misturadas com 3 mL da solução de ABTS<sup>•+</sup>. As soluções foram agitadas e, após 10 minutos, a absorbância das amostras foi determinada no comprimento de onda 734nm. As análises foram realizadas em triplicata e a percentagem de inibição (% I) em relação ao branco foi calculada pela equação:  $\% I = 100 \times (A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{branco}}$  onde  $A_{\text{branco}}$  é a absorbância do controle, uma solução que contém apenas a solução ABTS<sup>•+</sup>, e  $A_{\text{amostra}}$  é a absorbância do radical na presença das fases ou do padrão Trolox.

### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a atividade antioxidante, os resultados foram expressos como valores de  $CE50 \pm E.P.M.$ ; enquanto para o teor de fenólicos totais, os resultados foram expressos como mg EAG/g. Para avaliar a diferença entre os valores de CE50 entre as amostras foi utilizado Análise de Variância one-way, seguido do pós-teste de Bonferroni. Para o teor de fenólicos totais, utilizou-se Teste t de student,

empregando-se o Programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA), considerando como significativo valores de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Perfil metabolômico

Ocorreu uma maior quantidade de constituintes no período da tarde e diferença em relação à média das porcentagens do rendimento dos constituintes, no qual o da manhã obteve 1,36% de média (valor obtido através da soma das porcentagens da área de pico e dividido pela quantidade dos constituintes) e o da tarde, 1,33%. Porém, a quantidade de citral (neral + geranial), o composto majoritário, foi maior no período da tarde, onde juntos, somaram 17,60% de teor da amostra, comparado ao da manhã que somou 10,82%, demonstrando uma diferença de 6,78% de rendimento superior ao da manhã. Os compostos terpênicos, geraniol e nerol, também apresentaram maioria na coleta das 16:00 horas. O linalol foi indicado apenas no período da tarde, com pequena concentração (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Perfil metabolômico da *M. officinalis* coletada às 07h00 horas

RT	Área	% Área	Constituintes
3,20	1821309	4,24	Vinyl dimethylcarbinol
3,28	5336985	12,41	Hex-(2E)-enyl <3-methyl-> butanoate
3,34	3016742	7,03	Propylene glycol
3,56	2099303	4,89	Isobutyric acid
3,67	535824	1,25	Sorbic alcohol
3,82	27295	0,06	Butyraldehyde <2-methyl->
3,93	324050	0,75	Ethyl propenyl ketone
4,03	1130645	2,63	Isobutenyl methyl ketone
4,20	74626	0,17	Hexanol <n->
4,31	2115070	4,93	Sorbic alcohol
4,41	219195	0,51	Vinyl dimethylcarbinol
4,48	2769373	6,45	Artemisia ketone
4,67	603455	1,41	Benzene <ethyl->
4,79	764015	1,78	Prenol
5,09	1594548	3,71	Pent-(2E)-enal
5,22	161071	0,38	Benzene <ethyl->
5,27	92617	0,22	Nonane <n->
5,37	601617	1,4	Angelate <2-methylbutyl->
5,52	3456393	8,05	Acetate <isopropyl->
5,61	1269100	2,96	Isobutenyl methyl ketone
5,83	90125	0,21	Pentan-2-one <4-methyl->
5,90	145069	0,34	Pyrrole
5,99	2265495	5,28	Butyraldehyde <2-ethyl->

6,16	81337	0,19	Tetradec-1-ene
6,24	22771	0,05	Dodecyl acetate
6,42	121886	0,28	Nonane <n->
6,54	56255	0,13	Hexane <2-methyl->
6,61	803279	1,87	Octane <n->
6,85	283352	0,66	Tiglate <allyl->
6,90	153461	0,36	Pyruvate <ethyl->
7,01	32718	0,08	Propylene carbonate
7,11	104182	0,24	Isopropyl ethyl ketone
7,20	322002	0,75	Sorbic aldehyde
7,32	470063	1,09	Isobutenyl methyl ketone
7,42	20590	0,05	Propyl methyl ketone
7,50	15947	0,04	Sabinene
7,62	276380	0,64	Vinyl amyl carbinol
7,71	7548	0,02	Pyruvate <ethyl->
7,76	13076	0,03	Pimelic ketone
7,86	46598	0,11	Hept-3-en-2-one
8,02	218299	0,51	Myrcene
8,17	106267	0,25	Mesitylene
8,28	199466	0,46	Decane <n->
9,10	75214	0,18	Hexane <3-methyl->
9,21	13952	0,03	Mesitylene
9,51	56020	0,13	Tiglate <(3Z)-hexenyl->
9,72	41245	0,1	Ocimene <(E)-, beta->
10,13	93088	0,22	Ocimene <(E)-, beta->
10,36	6484	0,02	Nona-(2E,6E)-dienal
10,44	54230	0,13	Dodec-2-en-1-ol <trans->
10,57	38390	0,09	Hexane <3-methyl->
10,71	46367	0,11	Dodecane <n->
10,94	75890	0,18	Menth-2-en-1-ol <cis-, para->
12,20	328153	0,76	Undecane <n->
12,69	42603	0,1	Menth-3-ene <para->
12,93	64966	0,15	Phenethyl alcohol
13,40	30338	0,07	Ambrettolide
14,11	14970	0,03	Diazabenzene <1,4->
14,47	13815	0,03	Chrysanthemol <trans->
16,60	62799	0,15	Dodecane <n->
17,98	408263	0,95	Nerol
18,56	1490642	3,47	Neral
19,17	1159040	2,7	Geraniol
19,91	3157593	7,35	Geranial
21,13	19179	0,04	Dodecane <n->
25,02	26695	0,06	Elemene <beta->
25,33	446645	1,04	Elemene <beta->
26,55	757897	1,77	Caryophyllene <(E)->
28,05	101452	0,24	Farnesene <(E)-, beta->

29,41	175518	0,41	Selinene <beta->
29,79	64351	0,15	Selinene <alpha->
33,43	51323	0,12	Caryophyllene oxide
44,79	150656	0,35	Linolenate <methyl->

Fonte: A autora (2017)

Tabela 2 - Perfil metabolômico da *M. officinalis* coletada às 16h00 horas.

RT	Área	% Área	Constituintes
3,12	15545	0,12	Adipic ketone
3,21	111931	0,85	Vinyldimethylcarbinol
3,28	268332	2,04	Hexane <3-methyl->
3,34	415614	3,16	Decane <n->
3,50	20882	0,16	Adipic ketone
3,57	142766	1,09	Isobutyric acid
3,79	30493	0,23	Nonane <n->
3,92	60315	0,46	Ionane
4,02	75088	0,57	Angelicalactone <alpha->
4,10	28129	0,21	Carbinol <sec-butyl->
4,19	7091	0,05	Hexa-2,4-dienyl butyrate
4,33	537266	4,09	Hex-(3Z)-enol
4,50	253111	1,93	Benzene <ethyl->
4,67	441387	3,36	Benzene <ethyl->
4,74	1311614	9,98	Isoamyl acetate
4,80	362196	2,76	Acetate <2-methylbutyl->
4,98	13727	0,1	Hexahydrotoluene
5,08	378708	2,88	Pent-(2E)-enal
5,22	159408	1,21	Benzene <ethyl->
5,27	60537	0,46	Nonane <n->
5,36	56441	0,43	Octane <n->
5,52	65050	0,5	Acetate <isopropyl->
5,99	30335	0,23	Pyruvate <ethyl->
6,86	24354	0,19	Phenylacetate <benzyl->
7,01	12988	0,1	Isopropyl ethyl ketone
7,11	237937	1,81	Mesitylene
7,23	11732	0,09	Furfural
7,32	74808	0,57	Mesitylene
7,50	31698	0,24	Sabinene
7,62	328589	2,5	Vinyl amyl carbinol
7,71	22893	0,17	Mesitylene
8,02	187351	1,43	Myrcene
8,16	270728	2,06	Mesitylene
8,28	52368	0,4	Decane <n->
8,56	23790	0,18	Hex-(3Z)-enyl acetate
9,21	48848	0,37	Mesitylene

9,72	79183	0,6	Propionate <3-phenylpropyl->
10,14	68752	0,52	Ocimene <(E)-, beta->
10,21	9574	0,07	Benzenepropanenitrile <4-ethyl-, alpha,alpha-, dimethyl->
10,28	20954	0,16	Propionaldehyde <2-phenyl->
10,43	37484	0,29	Propiophenone
10,57	53226	0,41	Cymene <para->
10,71	29507	0,22	Dodecane <n->
10,94	69635	0,53	Menth-2-en-1-ol <cis-, para->
11,33	21490	0,16	Cymene <para->
11,67	29915	0,23	Cymene <para->
11,74	19325	0,15	Cymenene <para->
12,19	46708	0,36	Isopropyl ethyl ketone
12,26	63353	0,48	Linalool
12,94	77206	0,59	Cymene <ortho->
13,15	43041	0,33	Cymene <para->
13,97	35273	0,27	Cymenene <para->
14,45	41489	0,32	Cymenene <para->
14,56	22242	0,17	Benzenepropanenitrile <4-ethyl-, alpha,alpha-, dimethyl->
16,60	39260	0,3	Dodecane <n->
17,98	538587	4,1	Nerol
18,56	726494	5,53	Neral
19,18	1096338	8,35	Geraniol
19,91	1585270	12,07	Geranial
24,92	19341	0,15	Geranyl acetate
25,33	386186	2,94	Elemene <beta->
25,55	132515	1,01	Tetradecane <n->
26,55	543757	4,14	Caryophyllene <(E)->
28,06	113732	0,87	Farnesene <(E)-, beta->
29,41	142530	1,08	Selinene <beta->
29,80	292631	2,23	Pentadecane <n->
33,42	56607	0,43	Caryophyllene oxide
33,86	20534	0,16	Tetradecane <n->
36,54	31732	0,24	Heptanal <cyclic-, ethylene-> acetal
42,40	26830	0,2	Heptanal <cyclic-, ethylene-> acetal
44,79	305141	2,32	Linolenate <methyl->
47,60	29669	0,23	Heptanal <cyclic-, ethylene-> acetal
52,39	29269	0,22	Heptanal <cyclic-, ethylene-> acetal
55,88	42928	0,33	Dodecanoate <isopentyl->
60,75	34672	0,26	Heptanal <cyclic-, ethylene-> acetal

Fonte: A autora (2017)

Os óleos essenciais estão ligados às necessidades do vegetal para sobreviver dentro do ecossistema, desempenhando ação contra microorganismos, insetos e predadores (SIMÕES; et al, 2004). A *M. officinalis* tem em sua composição



óleo essencial composto principalmente por citral, mas também há presença de limoneno, linalol, geraniol, citronelal e citronelol, além dos flavonoides, taninos, mucilagens, ácidos triterpenóides, resinas e compostos amargos (LORENZI; MATOS, 2002). O citral é formado por geranial e neral, são monoterpênicos responsáveis pela ação calmante da planta. (SADRAEI; GHANNADI; MALEKSHAHI, 2003). Seu uso é bastante elevado na indústria alimentícia, principalmente por atribuir às plantas um aroma forte e agradável (CARNAT; et al., 1998). O Geraniol é geralmente encontrado nas plantas cítricas, rosas, flores. Nas ervas elas estão localizadas nos tecidos vegetais. Sua presença, normalmente, é acompanhada do citral, que são responsáveis por sua oxidação (IIJIMA; et al., 2004).

O óleo essencial, por apresentar alto poder antioxidante, é utilizado para preparação de produtos farmacêuticos que apresentam funções antifúngicas, sendo bastante eficiente contra patógenos. Também possui ação antibiótica, antibacteriana e sedativa (TEKEL; et al, 1997), como também para problemas do sistema nervoso, tratamento contra insônia e na cicatrização de feridas. E ainda, os taninos presentes na planta apresentam importante ação antiviral, principalmente sobre o vírus da herpes (LORENZI; MATOS, 2002). Suas funções antioxidativas, antivirótica, antifúngica, sedativa e antimicrobiana despertam o interesse farmacológico para a *M. officinalis* e seus metabólitos secundários (TESKE; TRENTINI, 1997; LORENZI; MATOS, 2008). A concentração do óleo varia de acordo com as condições externas como clima, condições geográficas, tempo de colheita, tipo de técnica de extração (SHAKERI; SAHEBKAR; JAVADI, 2016).

Através da hidrodestilação, é obtido a extração do óleo essencial da *Melissa officinalis*, seu baixo rendimento (0,02 a 0,40% os classifica como sendo um dos óleos mais valiosos. Além de seu baixo rendimento, suas propriedades farmacológica também contribuem para elevado preço (SORENSEN, 2000).

De acordo com o trabalho realizado por MENEZES (2012), os óleos essenciais da *M. officinalis* apresentou destaque na atividade antifúngica contra cepas de *C. carrioni*, interferindo no seu crescimento, sendo capaz de inibir a germinação dos fungos. E o geranial apresentou como sendo o composto majoritário da extração do óleo essencial da planta.

Schnitzler; et al. (2008), estudando os constituintes da planta, constatou que os compostos majoritários do óleo essencial extraídos da *M. officinalis* foi o citral, seguido por citronelal.

Blank, et al. (2005) ao estudar a influência do horário de colheita das folhas em relação ao teor de óleo essencial da *Melissa officinalis*, constatou que houve alteração da quantidade de óleo produzido, de acordo com os horários coletados. As folhas frescas, cultivadas no campo, colhidas às 17:00 horas foram as que apresentaram maior conteúdo do óleo essencial. Filho, et al. (2002), analisando o horário de colheita e secagem das folhas na produção de óleo essencial da *Melissa officinalis* produzida no campo, constatou que entre as colheitas das 8 h, 11 h, 14 h e 17 h; o horário das 11 hrs e 17:00 horas obteve o maior teor de óleos essenciais, porém o horário das 17:00 com um quantidade maior de óleo 1653 e 2,370 ml/100g, tanto para folhas frescas, como para as folhas submetidas a secagem.

Nascimento, et al (2003), buscando avaliar o efeito do horário de corte no óleo essencial de capim santo, analisou que entre 09:00 e 11:00 horas obteve o maior teor de óleo essencial. Melo, et al. (2011) em seu trabalho sobre o teor do óleo essencial do alecrim-pimenta, também certificou que o período da manhã atinge o melhor rendimento, precisamente às 10:00 horas.

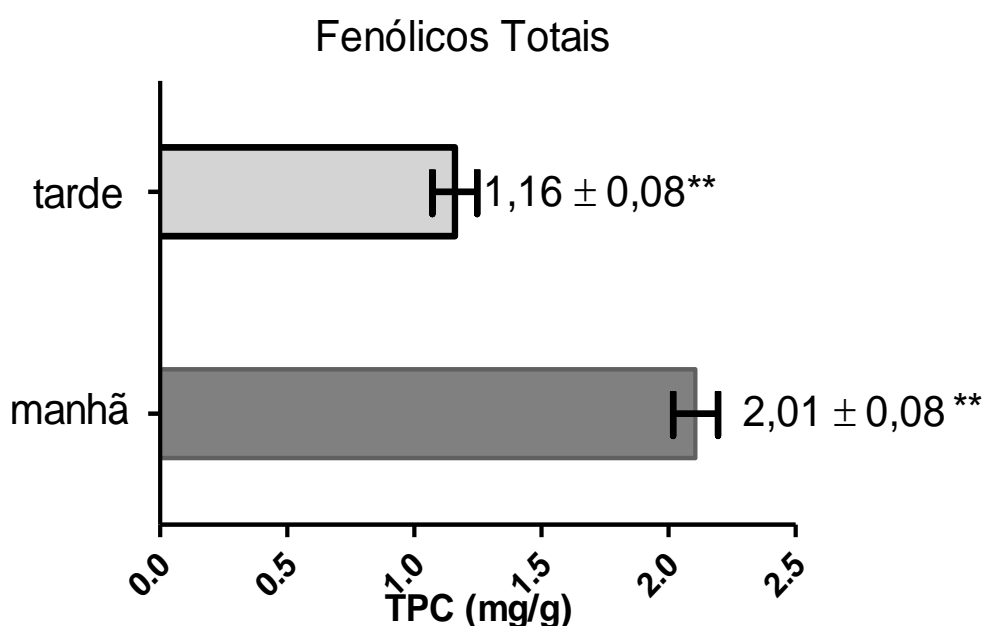
As diferenças dos melhores horários de colheitas sob distintas espécies de plantas para obtenção de óleos essenciais, mostram que não existe um padrão de horário para angariar melhor concentração, pois cada espécie tem sua variação particular no tempo do seu ciclo (QUEIROZ; et al., 2016). Assim como, cada planta tem sua composição dependendo de fatores que influenciam diretamente sua formação. Fatores como temperatura, sazonalidade e horário de coleta podem contribuir efetiva e negativamente para a concentração dos óleos essenciais (MORAIS, 2009).

## 5.2. Determinação dos compostos fenólicos totais

A determinação dos fenólicos totais foi identificada através do método Folin Ciocalteu.

As médias obtidas na quantificação dos compostos fenólicos totais da *Melissa officinalis*, apresentaram um valor muito baixo dos compostos, nas duas colheitas, porém a colheita das 07:00 horas, apresentou uma maior quantidade de fenólicos, de  $2,01 \pm 0,08$  mg/g, do que as plantas colhidas às 16:00 horas, que mostrou uma quantidade de teor de fenólicos totais de  $1,16 \pm 0,08$  mg/g, apresentando uma diferença significativa entre elas (Gráfico 1).

**Gráfico 1** - Teor de Fenólicos Totais das amostras coletadas no período da manhã (07h00) e no período da tarde (16h00).



Os valores estão expressos como TPC  $\pm$  E.P.M.  $^{**}p < 0,005$ , para diferença entre as amostras

Resultados de Moraes-de-Souza (2007) apresentou valores, através de sua pesquisa sobre a composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil, no qual constatou que a erva que possuiu maior teor fenólico entre as estudadas, foi a *Melissa officinalis*, a qual apresentou  $46,46 \pm 0,44$  mg/g quando processada e  $17,97 \pm 0,11$  mg/g da infusão da erva fresca. Moraes-de-Souza atribuiu o baixo valor

de fenólicos da erva fresca à concentração de umidade, visto que as processadas passam por processo de secagem, concentrando seus constituintes.

Estudos realizados por Atanassova, Georgieva e Ivancheva (2011), também concluíram um alto teor de compostos fenólicos para a *Melissa officinalis* de 48.86 mg GAE/100g DW (folha seca), comparado as ervas também da família Lamiaceae, *Salvia officinalis* (sálvia) e *Mentha piperita* (hortelã), que tiveram o total de 27.94 mg GAE/100g DW e 45.25mg GAE/100g DW, respectivamente.

Segundo Duda, et al. (2015), os diferentes métodos e formas de expressão dos resultados entravam comparações com trabalhos equivalentes na literatura. Os autores observaram as alterações dos principais compostos bioativos com atividade antioxidante pelo efeito de tempo de colheita de quatro plantas, incluindo a *Melissa officinalis*. A colheita foi realizada no início da floração e na plena floração, no dia 09 de junho e 19 de junho, às 11:00 horas e às 16:00 horas de cada dia. Identificaram que, para obter a melhor concentração de compostos fenólicos, o melhor período é o vegetativo máximo, em condições temperadas e à tarde.

As plantas possuem compostos que variam em cada horário, de acordo com suas atividades metabólicas e os fatores externos que afetam diretamente em suas propriedades. A quantificação dos compostos fenólicos também pode estar atribuída às condições que a planta se encontra (WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYYS; 2007), o que deve explicar a baixa concentração da amostra coletada neste trabalho. Porém, o horário da manhã demonstrou que sua presença foi significativa comparada ao da tarde.

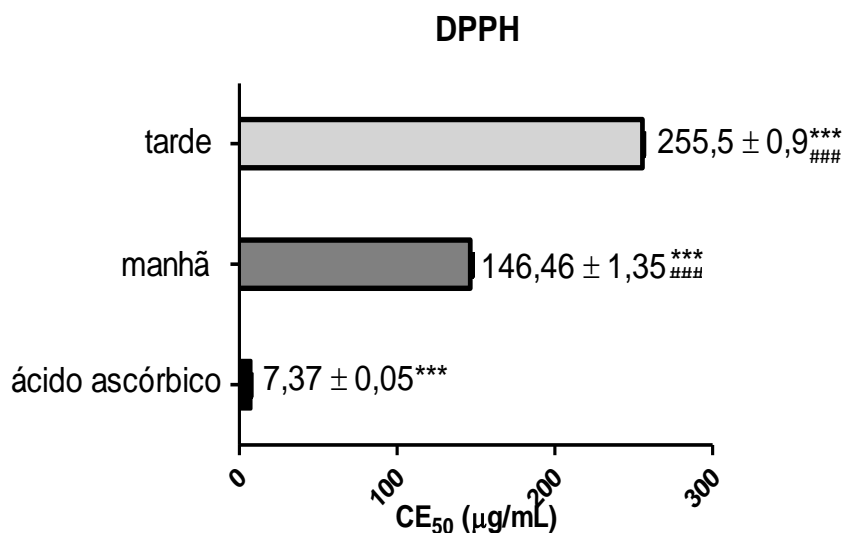
Portanto, é possível julgar que o resultado antioxidante da planta foi atribuído também a outros constituintes presentes na planta.

### 5.3. Atividade Antioxidante

Foram utilizados os métodos DPPH e Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox para mensurar a capacidade antioxidante da amostra. A  $CE_{50}$  é a concentração efetiva para inibir 50% dos radicais livres, calculada de acordo com os resultados das diferentes concentrações utilizadas. Logo, quanto menor for o valor da  $CE_{50}$ , melhor será a atividade antioxidante.

Para o teste do DPPH, houve diferença significativa, da  $CE_{50}$ , entre as coletas da manhã ( $146,46 \pm 1,35 \mu\text{g/mL}$ ) e da tarde ( $255,5 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ ), em relação ao ácido ascórbico ( $7,37 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ ). Também houve diferença entre as coletas, concluindo que a coleta da manhã apresentou uma melhor atividade antioxidante, para o teste em questão (Gráfico 2).

**Gráfico 2** - Atividade antioxidante pelo método do DPPH, das amostras coletadas no período da manhã (07h00) e no período da tarde (16h00).

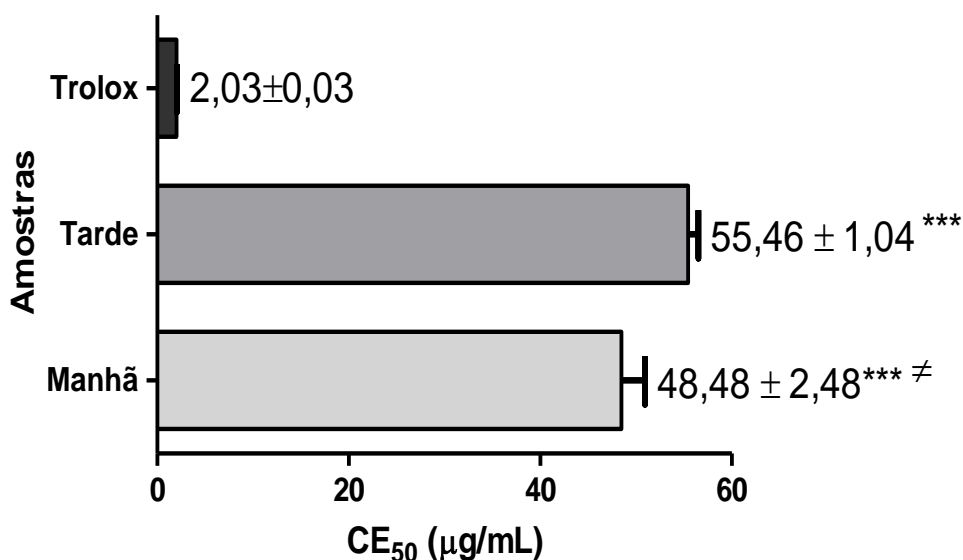


Os valores estão expressos como  $CE_{50} \pm \text{E.P.M.}$ . \*\*\* $p < 0,0005$ , para comparação das amostras com a substância padrão (ácido ascórbico); ### $p < 0,0005$ , para comparação entre as amostras.

No método Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, a melhor atividade antioxidante também decorreu pela manhã, que apresentou um valor de  $CE_{50}$  de  $48,48 \pm 2,48 \mu\text{g/mL}$ , havendo diferença significativa em relação à coleta da tarde, com uma  $CE_{50}$  de  $55,46 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$ . Também houve diferença entre as coletas e

o Trolox, composto padrão, que apresentou uma CE<sub>50</sub> de  $2,03 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$  (Gráfico 3).

**Gráfico 3** - Atividade antioxidante, pelo método da Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, das amostras coletadas no período da manhã (07h00) e no período da tarde (16h00).



Os valores estão expressos como Média  $\pm$  E.P.M. \*\*\* $p < 0,0005$ , para comparação das amostra com a substância padrão (Trolox); # $p < 0,05$ , para comparação entre as amostras.

Hussain, et al. (2011), estudando a atividade antioxidante de óleos essenciais de quatro plantas da família Lamiaceae, pelo método DPPH, identificou um CE<sub>50</sub> de  $62.3 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$  para a *Salvia officinalis*,  $69.9 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$  para a *Melissa officinalis*,  $289.0 \pm 8.5 \mu\text{g/mL}$  para a *Lavandula angustifolia* e  $225.7 \pm 6.7 \mu\text{g/mL}$  para *Pogostemon cablin*, no qual se viu os melhores resultados antioxidantes para a *Salvia* e *Melissa officinalis*.

Extratos polifenólicos de três gêneros Lamiaceae foram observados por Stagos, et al.(2012) quanto a sua capacidade antioxidante. Através do método DPPH, atribuiu o CE<sub>50</sub>, que variou de  $8 \pm 0,3$  a  $94 \pm 1.0$  e o método ABTS variou de  $12 \pm 0.3$  a  $95 \pm 2.3$ . Nos dois métodos a *Salvia* apresentou o valor mais potente, seguido por - em ordem decrescente - *Mentha* e *Sideritis*, havendo uma alta correlação entre os dois métodos.

Azevedo, et al., (2011), avaliaram o potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico de plantas usadas como chás. Através do método de DPPH, o

Capim Santo (*Cymbopogon citratus*) apresentou o melhor CE50 de 0,73 µg/mL com diferença estatística no nível de 5%, já a hortelã de folha grande (*Mentha crispa* L.) obteve CE50 de 3,70 µg/mL e a *Melissa officinalis* apresentou o CE50 de 3,22 µg/mL, demonstrando também uma considerada atividade antioxidante.

Wojdylo, Oszmianski, Czemerys (2007) analisaram a atividade antioxidante e quantidade de compostos fenólicos de 32 ervas, incluindo as plantas da família Lamiaceae, dentre elas, a *Melissa officinalis*, que obteve um resultado de fenólicos totais de  $13,2 \pm 0,13$  GAE/100g DW, DPPH de  $36,1 \pm 1,03$  µM trolox /100g DW e ABTS de  $10,6 \pm 0,09$  µM trolox /100g DW. A *Melissa officinalis* apresentou uma das plantas com menor teor fenólico, e com DPPH melhor do que o método ABTS, porém, com atividade antioxidante mediana..

Há uma sequência de fatores que afetam a qualidade e quantidade de antioxidantes da planta, como o horário de colheita, o tipo de solo, condições climáticas, métodos antioxidantes, extração e solventes, tempo de armazenamento das plantas ou extratos (DUDA, et al., 2015). Portanto, para cada região, as condições não somente biológicas, como externas, irão contribuir para o teor antioxidante.

Segundo Luz, et al., 2014, a colheita do verão contribui para melhor biomassa da *M. officinalis*, devido a temperatura, radiação solar e umidade relativa elevadas, auxiliando para seu desenvolvimento. O composto geranial e neral tem maior concentração no verão, já o citronelal apareceu nas folhas cultivadas no inverno.

A *Melissa officinalis* apresenta uma boa atividade antioxidante, porém, os fatores externos como solo, clima e temperatura podem ter influenciado diretamente com o resultado obtido neste trabalho. Portanto, não há como ter um padrão de quantidade efetiva de antioxidante, o que é possível certificar é a eficaz composição antioxidante que a planta estudada possui e entender a influência dos horários sobre sua composição.

## 6 CONCLUSÕES

- Através deste trabalho foi possível verificar a influência de fatores ambientais na composição das plantas, como o horário da colheita. Podendo concluir que os compostos majoritários apresentaram melhor concentração na colheita da tarde e, no horário da manhã, foi obtido melhor atividade antioxidante, fazendo entender que, outros constituintes da planta também contribuam para a atividade antioxidante.
- Este trabalho elucidou que o horário correto para a colheita das ervas é essencial para a obtenção dos constituintes desejados.
- Além disso, também buscou contribuir para as pesquisas voltadas às plantas utilizadas como chá, estudando os constituintes que compõem a planta, de modo que facilite a compreensão de seus efeitos antioxidantes sobre o ser humano. Como também, aferir a presença de compostos fenólicos totais, relevantes para o potencial redox, que auxiliam no combate aos radicais livres.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNUR, P. V. Metabolômica e Espectrometria de Massas. Circular técnica. Informação Tecnológica em Agricultura. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011.

ATANASSOVA, M.; GEORGIEVA, S.; IVANCHEVA, K. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, p.81-88, 2011.

AZEVEDO, R.R.S.; ALMEIDA, E.M.F.; SILVA, E. M.F.; SILVA, A.L.; GOMES, N.R.S.; MATIAS, T.M.S.; SOUZA, L.I.O.; SANTOS, A.F. Potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico de plantas usadas como chás. *Revista Semente*, 6(6): 240-249, 2011.

BARNES, J.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. Plantas medicinales: guía para los profesionales de la salud. Barcelona 1ª ed. 2005: Pharma editors, 568. P

BARREIROS, André L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Revista Química Nova*, 29(1): 13-123, 2006

BLANK, A.F, FONTES, S.M.1; CARVALHO FILHO, J.L.S.1; ALVES, P.B.2; SILVA-MANN, R.1; MENDONÇA, M.C.1; ARRIGONI-BLANK, M.F.1; RODRIGUES, M.O.. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes, *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.8(1): 73-78, 2005

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F.; Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Revista Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer – Goiânia, 7(12): 2011

CARNAT, A. P.; CARNAT, A.; FRAISSE, D.; LAMAISSON, J. L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L subsp. *Officinalis*) tea. *Rev. Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72: 301-5, 1998.

CHAVES, T.P. Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade Estadual da Paraíba, 2012.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

COLUSSI, T.C.; DALMOLIN, L.F.; PACHTMANN, M.; FREITAS, G.B.L. Melissa *officinalis* L.: Características gerais e biossíntese dos principais metabólitos secundários. *Revista de Biologia e Farmácia*, 5 (2): 89-100, 2011

CRAIG, W. J.; Health-promoting properties of common herbs. *Rev. Am J Clin Nutr.* 70: 491S–499S, 1999.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95, 2002.

DUDA, S.C.; MARGUITAS, L.A.; DEZMIREAN, D.; DUDA, M.; MARGAOAN, R.; BOBIS, O. Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species. *Revista Industrial Crops and Products*, 77:499-507, 2015.

FILHO, J.L.S.C.; SANTOS, M.F.; OLIVEIRA, A.S.; COSTA, A.G.; ALVES, P.B.; FILHO, L.G.M.S.; DANTAS, I.B.; AZEVEDO, V.G.; SILVA-MANN, R.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA, P.A.; AMANCIO, V.F.; MENDONÇA, M.C.; BLANK, A.F. Avaliação de horário de colheita e secagem das folhas na produção de óleo essencial de erva cidreira verdadeira produzida em campo. 2002.

FONSECA, J. J. S. Metodologia da pesquisa científica. Fortaleza: UEC, 2002. Apostila

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4): 627-641, 2008.

GIL, A. C. Como elaborar projetos de pesquisa. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2007.

HALLIWELL, B.; Gutteridge, J. M. C.; Cross, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 119: 598, 1992

HARA, Y. et al. Chemical composition of tea. *Food Reviews International*, New York, 11: 435-456, 1995.

HARA, Y.; LUO, S.J.; WICKREMASHINGHE, R.L.; YAMANISHI, T. Chemical composition of tea. *Food Reviews International*, 11: 435-456, 1995.

HARBOWY M.E., Balentine D.A., Tea chemistry. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 415–480, 1997

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; IQBAL, T.; BHATTI, I.A. Antioxidant attributes of four *Lamiaceae* essential oils. *Pak. J. Bot.*, 43(2): 1315-1321, 2011.

IJIMA, Y.; GANG, D.R.; FRIDMAN, E.; LEWINSOHN, E.; PICHESKY, E. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiology*. 134(1): 370-9, 2004

LAI, S.; SMITH, D.M.; BOOREN, A.M.; CRACKEL, R.L.; BUCKLEY, D.J. Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the

development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. *Journal of Food Science*, Chicago, 56(3): 616-620, 1991.

LAUNERT, E. *The HamLyn guide to edible medicinal plants of Britain and Northern Europe*. London: HamLyn, 1989.

LEME, G. M. *Desenvolvimento de método analítico para estudo metabolômico de cana-de-açúcar*, 2011.

LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M.A.C.; CRUZ, A.V.M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenoides em plantas. *Floresta e ambiente*. Seropédica, 10:71-77, 2003

LIMA, A. Caracterização química , avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi ( *Caryocar brasiliense*, Camb). Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas Da Universidade de São Paulo, p. 182 , 2008

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. *Revista Fitos Eletrônica*, [S.l.], 3(03): 14-24, 2007.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. *Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 512, 2002

LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; HABBER, L.L.; MARQUEZ, M.O.M. Produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações. *Rev. bras. plantas med.* [online]. 16(3): 552-560, 2014

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. & VEIGA, V.E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 23: 429-438, 2002

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGANOLO, N. Revisão: Antioxidantes naturais da família Lamiaceae - Aplicação em produtos alimentícios. *Braz J Food Technol* 10: 96- 103, 2007

MARTINS, P.M. Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e da composição química do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf.). 91p. (Dissertação em Engenharia Agrícola). Departamento de Engenharia Agrícola – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais 2000

MELO, M.T.P.; RIBEIRO, J.M.; MEIRA, M.R.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R. Teor de óleo essencial de alecrim-pimenta em função do horário de colheita. *Ciência Rural*, Santa Maria, 41(7): 1166-1169, 2011.

MENEZES, C. P. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (erva-cidreira)\_ sobre *Cladosporium carrionii*. *JP*, 60-83, 2012

MING, L. *Cultivation and Processing of Medicinal Plants*. Budapest: University of Horticultural Sciences, 338, 1992

MORAES-DE-SOUZA, R.A.; Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2007.

MORAES-DE-SOUZA, R.A.; OLDONI, T.L.C.; CABRAL, I.S.R.; ALENCAR, S.M. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no Brasil. B.CEPPA, Curitiba, 29(2): 229-236, 2011.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. Horticultura Brasileira 27: S4050-S4063.. EMBRAPA- SP, 2009

NASCIMENTO, I.B.; INNECCO, R.; MARCO, C.A.; MATOS, S.H.; NAGAO, O. Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim-santo. Revista Ciência Agronômica, 34(2): 169 – 172, 2003

NASCIMENTO, I.B.; INNECCO, R.; MARCO, C.A.; MATTOS, S.H.; NAGAO, E.O. Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim santo. Revista Ciência Agronômica, 34(2): 169 – 172, 2003

OLIVEIRA, L.A.R.; MACHADO, R.D.I; RODRIGUES, A.J.L.. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis. Revista Brasileira de Plantas Medicinai. 16(1): 32-40, 2014.

PEREIRA, A. A. Efeito inibitório de óleos essencial sobre o crescimento de bactéria e fungos. Lavras. Dissertação (Mestrado), Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, 58p 2006.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. Journal of Biotechnology and Biodiversity. [S.I.], v.3, n. 4, 2012.

QUEIROZ, T.B.; MENDES, A.D.R.; SILVA, J.C.R.L.; FONSECA, F.S.A.; MARTINS, E.R. Teor e composição química do óleo essencial de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) em função dos horários de coleta. Minas Gerais, 2016.

RE, R; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, New York, v.26, p.1231–1237, 1999

REIS, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; CORRÊA, R.M. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. in vitro sob influência do meio de cultura. Maringa, 31: 331- 335, 2009

RIBEIRO JÚNIOR, J.I. Análises estatísticas no SAEG. Viçosa: UFV, 301, 2001

SADRAEI, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. Fitoterapia, n.74, p.445-452, 2003.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 5. ed., Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004.

SCHNITZLER, P; SCHUHMACHER, A.; ASTANI, A.; REICHLING, J. Melissa officinalis oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. Phytomedicine. 15(9):734-40, 2008

SHAKERI, A.; SAHEBKAR, A.; JAVADI, B. *Melissa officinalis* L: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J Ethnopharmacol. 188: 204–228, 2016

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R.. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 5 ed Florianópolis: Ed. UFRGS: 821, 2004

SORENSEN, J. M. *Melissa officinalis*. The International Journal of Aromatherapy, 10 (1): 7-15, 2000.

SOUSA, C.M.M., SILVA, H.R., VIEIRA-Jr, G.M. AYRES, M.C.C., COSTA, C.L.S., ARAÚJO, D.S., CAVALCANTE, L.C.D., BARROS, E.D.S., ARAÚJO, P.B.M., BRANDÃO, M.S., CHAVES, M.H.; Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quim. Nova, 30(2): 351-355, 2007.

SOUZA, T.J.T.; APEL, M.A.; BORDIGNON, S.; MATZENBACHER, N.I.; ZUANAZZI, J.A.S.; HENRIQUES, A.T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. Rev Bras Farmacogn, 17: 368-372, 2007

SOUZA, G. S. et al. Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. Revista Biotemas, 24(3): p. 1-11, 2011.

STAGOS, D.; PORTESIS, N.; MOSSIALOS, D.; ALIGIANNIS, N.; CHAITA, E.; PANAGOULIS, C.; RERI, E. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. Food and Chemical Toxicology. 4115-4124, 2012

SUCUPIRA, N.R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. Cient. Ciênc. Biol. Saúde, 14(4): 263 – 269, 2012.

SUN-WATERHOUSE, D.; THAKOARLAL, J.; ZHOU, J. Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. International Journal of Food Science & Technology, 46(8): 1575-1585, 2011.

TEKEL, J.; HOLLÁ, M.; VAVERKOVÁ, S.; SVAJDLENKA, E. Determination of uracil herbicide residues and componentes of essential oil in *Melissa officinalis* L. In its main development phases. Journal of Essential Oil Research, 9: 63-66, 1997.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. Herbarium – Compêndio de Fitoterapia. 3.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997. 317p.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J.; Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol. Cell. Biochem. 266: 37, 2004

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; MUSTAFA, N. R.; KIM, H. K. Metabolomics: back to basics. Phytochemistry Reviews, 7(3): 525-537, 2008.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry, 940-949, 2007.